Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Article
Vol. 17, No.1, 2025, p. 77-92

Investigation of the Effects of Native Probiotics on the Performance, Immune Response, Morphology, and Intestinal *Lactobacillus* Population in Broiler Chicks

Ramin Seighalani[1]*, Maryam Royan[2], Majid Mottaghitalab[3], Fatemeh Zare[4]

1- Instructor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), North Region Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
2- Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), North Region Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
3- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran
4- Instructor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), North Region Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
*Corresponding Author's Email: raminseighalani@abrii.ac.ir

Received: 03-07-2024 Revised: 24-12-2024 Accepted: 28-12-2024 Available Online: 23-04-2025	**How to cite this article:** Seighalani, R., Royan, M., Mottaghitalab, M., & Zare, F. (2025). Investigation of the effects of native probiotics on the performance, immune response, morphology, and intestinal *Lactobacillus* population in broiler chicks. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *17*(1), 77-92. (in Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ijasr.2024.88990.1209

Introduction: Various factors have been reported to influence broiler chicken performance, including environmental conditions, nutrition, management practices, and genetics. One of the priorities in poultry production is the availability of effective alternatives to antibiotics, and the native strains of this type of alternative have various advantages. Probiotics as live microbial supplements in feed improve the microbial balance of the gastrointestinal tract and then improve animal health. Probiotics can enhance growth performance, support the immune system, aid nutrient digestion, and positively influence the microbial population of the gastrointestinal tract. Commercial probiotics are the most commonly used; however, screening the natural flora of the gastrointestinal tract has become a valuable approach in identifying effective probiotic strains. Selecting the optimal species for use in probiotic supplements is largely experimental and depends on their proven impact on the performance of living organisms. This project aimed to investigate the effects of indigenous probiotics on broiler chickens.

Materials and Methods: The probiotics included strains of *Lactobacillus reuteri* isolated from native chickens in Oshnavieh, Shush, Shaft, and Masal, as well as *Lactobacillus salivarius* isolated from native ducks in Mazandaran. The study aimed to assess the impact of these probiotics on the performance, immune response, morphology, and gut lactobacillus population in broiler chickens. The single strain (Plr2) and combination strains (Plr9, Plr10, Plr11, and Plr12) were evaluated in a completely randomized design. There were seven treatments, each with four replicates, and 16 one-day-old Ross 308 broiler chickens per replicate. Treatments include 1) control: basic diet without any additive, 2) Positive control 2: basic diet + commercial probiotic, 3) Basic ration + 1.36×10^9

https://doi.org/10.22067/ijasr.2024.88990.1209

CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen (Plr_2), 4) Basic ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck (Plr_9), 5) Basic ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck and *L. Reuteri* isolated from Shush native hen (Plr_{10}), 6) Basic ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck and *L. Reuteri* isolated from Shush native hen and *L. Reuteri* isolated from Shaft native hen (Plr_{11}) and 7) Basic ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck and *L. Reuteri* isolated from Shush native hen and *L. Reuteri* isolated from Shaft native hen and *L. Reuteri* isolated from Masal native hen (Plr_{12}).

Results and Discussion: There were no significant differences in feed intake, daily weight gain, or feed conversion ratio among the probiotic treatment groups. However, evaluation of antibody production against sheep red blood cells (SRBC) injected during the first 30 days of rearing showed that the Plr12 probiotic combination significantly increased IgG levels compared to the control group (without additives). The secondary immune response, measured 42 days after SRBC injection, showed an even greater increase in antibody levels. Additionally, all probiotic combinations significantly enhanced antibody levels compared to the control. It appears that as the chicks mature, their immune system continues to develop, and the memory cells generated during the initial immune response led to an increased production of antibodies during the subsequent response. Results derived from the broilers jejunum morphology study in the first experiment showed that the addition of the native probiotic combination Plr9, Plr11, and Plr12 to the diet resulted in a significant increase in the length of the intestinal villi of jejunum in chickens from the experimental groups when compared to chickens from the control group. Also, investigation of villus length/crypt depth and surface villus area indicated a significant increase in these traits in all probiotic treatments used compared to control treatments and commercial probiotic. The examination of the lactobacillus population in the cecal contents of broiler chickens showed that the combination of strains Plr9, Plr11, and Plr12 significantly increased the population of these beneficial bacteria compared to the control and commercial probiotic treatments. Each strain had specific probiotic properties. When these strains were combined and administered to broiler chickens, there was a significant increase in beneficial bacteria and a reduction in harmful bacteria.

Conclusions: This study demonstrates that probiotic bacteria, isolated from the microbial population of the digestive system of native birds, have the potential to serve as valuable dietary supplements in poultry nutrition. Each probiotic strain confers varying levels of optimal efficacy; as a result, these probiotics can be used individually or in combination, and they can replace antibiotics and commercial probiotics.

Keywords: Broiler chicken, Immnune response, Intestinal morphology, Microbial population, Probiotic

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۱۷، شماره ۱، بهار ۱۴۰۴، ص. ۹۲-۷۷

بررسی اثرات پروبیوتیک بومی بر عملکرد، پاسخ ایمنی، ریخت‌شناسی و جمعیت لاکتوباسیلوسی روده جوجه‌های گوشتی

رامین صیقلانی[1*]، مریم رویان[2]، مجید متقی طلب[3]، فاطمه زارع[4]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۸

چکیده

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر پروبیوتیک‌های بومی شامل *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* جداشده از مرغ‌ها و اردک بومی به‌صورت سویه‌های تکی (Plr2) و ترکیبی (Plr9, Plr10, Plr11, Plr12) بر ویژگی‌های عملکردی، پاسخ ایمنی و جمعیت لاکتوباسیلوسی روده در ۵۱۲ جوجه گوشتی نر نژاد راس ۳۰۸ بود. نتایج نشان داد که از نظر میزان خوراک مصرفی، افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای پروبیوتیکی مورد استفاده مشاهده نشد. بررسی آنتی‌بادی تولیدی علیه SRBC تزریق‌شده در ۳۰ روز اول پرورش نشان داد که ترکیب پروبیوتیکی Plr12 منجر به افزایش معنی‌داری IgG در مقایسه با شاهد گردید (P<۰/۰۱). پاسخ ثانویه در افزایش میزان این آنتی‌بادی در ۴۲ روز پس از تزریق SRBC با قدرت بیشتری همراه بود و در تمام ترکیبات پروبیوتیکی مورد استفاده به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده گردید (P<۰/۰۱). بررسی جمعیت لاکتوباسیلوسی سکوم جوجه‌های گوشتی مورد مطالعه نیز حاکی از آن بود که سویه‌های ترکیبی Plr9، Plr11 و Plr12 سبب افزایش معنی‌دار جمعیت این باکتری‌های مفید در مقایسه با شاهد و بیوپول (پروبیوتیک تجاری) گردید (P<۰/۰۱). مطالعه حاضر مشخص کرد که باکتری‌های با قابلیت پروبیوتیکی جداشده از جمعیت میکروبی موجود در دستگاه گوارش طیور بومی، چه به‌صورت تکی و چه در ترکیب با هم این پتانسیل را دارند که به‌عنوان یک مکمل غذایی باارزش، جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌های تجاری در تغذیه طیور شوند.

واژه‌های کلیدی: پاسخ ایمنی، پروبیوتیک، جمعیت میکروبی، جوجه گوشتی، ریخت‌شناسی روده

مقدمه

نژادهای مختلف مرغ بومی که در طولانی‌مدت در محیط‌های جغرافیایی متفاوت (از نظر توپوگرافی و آب‌وهوا) پرورش می‌یابند، به‌لحاظ ریزجانداران روده با یکدیگر تفاوت دارند. این تفاوت‌ها بیانگر نقش برجسته موقعیت جغرافیایی در شکل‌گیری جمعیت میکروبی روده مرغ می‌باشد. جمعیت میکروبی روده جوجه‌ها به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر بر سلامت و رشد آن‌ها شناخته می‌شود و به همین دلیل می‌تواند به منبعی برای جداسازی پروبیوتیک‌های بومی تبدیل شود (Amir Ebrahimi *et al*., 2022; Clavijo and Flórez, 2018; Ma *et al*., 2022). در سال‌های اخیر، پروبیوتیک‌ها به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها در تولید طیور مطرح شده‌اند. این ترکیبات قادرند که رشد باکتری‌های مفید را تقویت کنند و از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند (Elbaz *et al*., 2021). همچنین آنزیم‌های گوارشی مختلف تولید کرده و مولکول‌های تعدیل کننده ایمنی را برای حفظ تعادل جمعیت میکروبی روده در دام و طیور بهبود می‌بخشند. این عوامل به‌نوبه خود سبب کاهش بیماری‌های

۱- مربی، پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران
۲- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران
۳- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۴- مربی، پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: raminseighalaani@abrii.ac.ir)
https://doi.org/10.22067/ijasr.2024.88990.1209

روده‌ای، افزایش هضم و جذب خوراک، بهبود عملکرد ایمنی و در نهایت، افزایش عملکرد کلی می‌شوند (Rehman *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021; Kulkarni *et al.*, 2022). پروبیوتیک‌ها ممکن است حاوی یک یا تعداد بیشتری سویه میکروارگانیسمی باشند و می‌توانند به‌تنهایی یا در ترکیب با افزودنی‌های دیگر در آب یا غذا استفاده شوند. پروبیوتیک‌ها از طریق تأثیر بر بهبود جمعیت ریزجانداران دستگاه گوارش که ارتباط نزدیکی با تکامل سیستم ایمنی دارد، اثرات مفیدی بر سلامت و افزایش پتانسیل طیور ایجاد می‌کنند (Broom and Kogut, 2018). هنگامی‌که روده توسط یک گونه باکتریایی خاص اشغال شود، به‌دلیل محدویت فضای قابل سکونت، استقرار میکروب‌های دیگر در میان این جامعه دشوار می‌گردد (Cisek *et al.*, 2014). *لاکتوباسیلوس*، *پدیوکوک*، *لاکتوکوک*، *انتروکوک*، *استرپتوکوک* و *بیفیدوباکتریا* می‌توانند پروتئین‌ها یا باکتریوسین‌هایی (پپتیدهای ضدمیکروبی) تولید کنند که رشد باکتری‌های مضر را به حداقل برسانند. الگوی اصلی دفع بیمارگر به‌واسطه باکتریوسین، شامل نفوذ به غشاء سیتوپلاسمی باکتری‌های بیماری‌زا است که باعث مهار سنتز DNA و RNA می‌شود (Van Zyl *et al.*, 2020). باکتریوسین‌ها می‌توانند توانایی سلول‌های بیمارگر برای کلونیزاسیون دستگاه گوارش را محدود کرده و با سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک مبارزه کنند (Lajis, 2020). همچنین پروبیوتیک‌ها با افزایش سرعت هضم، قابلیت هضم را افزایش داده (Zhang and Kim, 2014)، و منجر به بهبود ساختار ریزجانداران سکوم و هضم مواد مغذی در جوجه‌های گوشتی می‌شوند (Khalid *et al.*, 2021). پژوهش‌های فراوانی به بررسی اثرات پروبیوتیک‌ها بر بهبود رشد و عملکرد پرندگان پرداخته‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که غنی‌سازی جیره با یک جدایه تکی لاکتوباسیلوسی (*L. fermentum* ،*L. casei* ،*L. bulgaricus* و *L. reuteri*) منجر به بهبود وزن بدن و کارآیی خوراک در جوجه‌های گوشتی می‌گردد (Apata, 2008; Nakphaichit *et al.*, 2011). علاوه‌بر بهبود عملکرد رشد، غنی‌سازی با پروبیوتیک‌ها منجر به ارتقاء عملکرد ایمنی جوجه‌های گوشتی نیز می‌گردد که این امر از طریق افزایش سطح ایمونوگلوبولین سرم/پلاسما، افزایش تیتر آنتی‌بادی در برابر به بیمارگرها و تغییر در تعداد سلول‌های ایمنی مشهود است (Ahmed *et*Bai *et al.*, 2013; *al.*, 2014). این پژوهش با هدف بررسی آثار سویه‌های *لاکتوباسیلوس روتری* مرغ‌های بومی اشنویه، شوش، شفت و ماسال و یک سویه *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* جداسازی‌شده از اردک بومی مازندران به‌صورت جداگانه و ترکیبی بر صفات عملکرد، پاسخ ایمنی، ریخت‌شناسی و جمعیت میکروبی دستگاه گوارش در طیور گوشتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

محل و زمان اجرای آزمایش

آزمایش با هدف بررسی اثر پروبیوتیک‌های بومی با منشأ داخلی در بهمن سال ۱۳۹۸ به‌مدت ۴۲ روز در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه گیلان انجام شد. ۵۱۲ قطعه جوجه گوشتی نر یک‌روزه سویه راس ۳۰۸ با میانگین وزن یک‌روزگی ۰/۷± ۴۳/۶گرم، از شرکت رامسر طیور تهیه گردید. سالن پرورش دارای ابعاد ۱۱/۶ متر عرض، ۴۶ متر طول و سه متر ارتفاع در وسط و دو متر در کنارهها بود. داخل سالن با استفاده از دیوارههایی به‌طول ۱/۵، عرض یک و ارتفاع یک متر به ۳۲ پن جداگانه تقسیم شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با هفت تیمار آزمایشی (هر تیمار دارای چهار تکرار و ۱۶ قطعه جوجه در هر تکرار) انجام گردید. تیمارهای آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است.

جیره‌های غذایی

جیره پایه، یک جیره تجاری فاقد آنتی‌بیوتیک بود که بر پایه ذرت و سویا برای دوره آغازین (۰ تا ۱۰ روزگی)، رشد (۱۱ تا ۲۴ روزگی) و پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی) فرموله شده بود. این جیره به‌صورت پودری تهیه شده بود و دو بار در روز (صبح و عصر) در ظروف دان‌خوری پر می‌شدند. جوجه‌ها در طول شبانه‌روز به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند.

تهیه پروبیوتیک بومی

سویه‌های پروبیوتیکی مورد استفاده در این پژوهش از یک پروژه غربالگری و جداسازی پروبیوتیکی به‌دست آمده‌اند که باکتری‌هایی با پتانسیل پروبیوتیکی را از منابع مختلف دام، طیور، آبزیان و حشرات صنعتی شناسایی کرده است. این باکتری‌ها شامل باکتری‌های اسید لاکتیکی گرم مثبت هستند که در برابر رنگ‌آمیزی گرم واکنش مثبتی نشان داده و با جذب کریستال ویوله توسط پپتیدوگلیکان موجود در دیواره به رنگ آبی تیره و بنفش دیده می‌شوند. همچنین، این باکتری‌ها کاتالاز منفی وKOH منفی (مخلوط نمودن کلنی باکتریایی با KOH سه درصد از جمله تست‌های افتراق باکتری گرم مثبت از باکتری گرم منفی است) نیز بودند. باکتری‌های انتخاب‌شده تمام تست‌های مربوط به تعیین خصوصیات پروبیوتیکی نظیر توانایی تحمل اسید معده، توانایی تحمل صفرای موجود در روده کوچک، مهار بیمارگرهای *سالمونلا اینتیریتیدیس*، *سالمونلا تیفی موریوم* و فقدان همولیز را پشت سر گذاشته و به‌منظور شناسایی مولکولی از نظر ناحیه 16s باکتریایی بررسی شدند. پس از خوانش، میزان شباهت قطعات مذکور با قطعات مشابه در بانک NCBI با استفاده از نرم‌افزار بلاست

مشخص شد و قطعات مذکور در بانک ژنی NCBI ثبت گردیدند (Royan *et al*., 2017). باکتری‌های انتخاب‌شده به‌طور جداگانه در محیط کشت MRS مایع، در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط بی هوازی کشت شدند. بعد از کشت جدایه‌ها، سلول‌های باکتریایی توسط سانتریفوژ جداسازی شده و سوپرناتانت این باکتری‌ها دور ریخته شد. پس از شستوشوی پلیت‌های باکتریایی، آن‌ها جداگانه توسط خشک کن انجمادی خشک شدند. پودرهای خشک‌شده به‌مدت چند ماه در یخچال و در دمای چهار درجه نگهداری شد. سپس هر یک از جدایه ها به‌منظور استفاده در تغذیه جوجه‌های گوشتی به‌میزان 1.36×10^9 CFU/g در آرد ذرت به‌منظور مخلوط نمودن با خوراک روزانه رقیق شدند.

جدول ۱– فهرست هفت گروه تیمار آزمایشی

Table 1- List of seven experimental treatment groups

	تیمار Treatment
1	جیره پایه (برمبنای ذرت و سویا)، کنترل منفی Basal ration (based on corn and soybean meal), negative control
2	پروبیوتیک تجاری (بیوپول) + جیره پایه، کنترل مثبت Basal ration + commercial probiotic (Biopol), positive control
3	جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه (Plr2) Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen (Plr_2)
4	جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه و *L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران (Plr9) Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck (Plr_9)
5	جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جدا شده از مرغ‌های بومی اشنویه، شوش و *L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران (Plr10) Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh, Shush native hens and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck (Plr_{10})
6	جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جدا شده از مرغ‌های بومی اشنویه، شوش، شفت و *L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران (Plr11) Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh, Shush, Shaft native hens and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck (Plr_{11})
7	جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جدا شده از مرغ‌های بومی اشنویه، شوش، شفت، ماسال و *L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران (Plr12) Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh, Shush, Shaft, Masal native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck (Plr_{12})

صفات مورد اندازه‌گیری آزمایش

خوراک مصرفی روزانه

مصرف خوراک روزانه (گرم/جوجه/روز) از تفاضل خوراک باقی‌مانده در آخر دوره مورد نظر از وزن خوراک ابتدای همان دوره و با استفاده از معادله ۱ براساس روز/ مرغ محاسبه شد.

افزایش وزن روزانه

با استفاده از معادله ۲، میزان افزایش وزن روزانه جوجه‌ها (برحسب گرم) براساس روز/مرغ محاسبه شد.

ضریب تبدیل خوراک

ضریب تبدیل خوراک از تقسیم میانگین مصرف خوراک روزانه هر دوره به میانگین افزایش وزن روزانه همان دوره طبق معادله ۳ محاسبه شد.

معادله (۱) روز مرغ= (تعداد تلفات × تعداد روز دوره) + (تعداد روزهای زنده‌مانی تلفات × تعداد جوجه در پایان دوره)

$$\text{خوراک مصرفی روزانه}=\frac{\text{وزن خوراک باقی‌مانده در انتهای دوره (گرم)} - \text{وزن خوراک در ابتدای دوره (گرم)}}{\text{روز مرغ}}$$

معادله (۲)

$$\text{افزایش وزن زنده روزانه}=\frac{\text{وزن تلفات تا انتهای دوره} + \text{وزن جوجه‌ها در ابتدای دوره} - \text{وزن جوجه‌ها در انتهای دوره}}{\text{روز مرغ}}$$

معادله (۳)

$$\text{ضریب تبدیل خوراک}=\frac{\text{میانگین مصرف خوراک روزانه (گرم)}}{\text{میانگین افزایش وزن روزانه (گرم)}}$$

اندازه‌گیری ایمنی هومورال

به‌منظور اندازه‌گیری پاسخ ایمنی هومورال، از تست هماگلوتیناسیون (تستی برای تعیین حساسیت ایمنی در جوجه‌ها با استفاده از آنتی‌بادی‌های هماگلوتینه‌کننده گلبول‌های قرمز گوسفندی) استفاده شد (Grasman, 2010). بدین منظور، ابتدا سوسپانسیون قابل تزریق SRBC تهیه شد و در مرحله بعد در روزهای ۲۲ و ۳۵ دوره پرورش، دو جوجه به‌طور تصادفی از هر قفس انتخاب و میزان ۰/۱ سی‌سی محلول ۲۵ درصد SRBC بوسیله سرنگ انسولین به عضله سینه جوجه‌ها تزریق گردید. برای اندازه‌گیری پاسخ ایمنی هومورال، در روزهای ۳۰ و ۴۲ از ورید بال جوجه‌ها یک سی‌سی خون گرفته شد و آنتی‌بادی‌های IgG، IgM و ایمونوگلوبولین کل مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند.

ریخت‌شناسی روده کوچک

به‌منظور بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی روده کوچک، در روز ۴۲ از هر تکرار سه پرنده انتخاب شد و نمونه‌های تهی‌روده (ژژونوم) آن‌ها جدا و پس از شستوشو با محلول نرمال سالین، در محلول ۱۰ درصد فرمالین قرار گرفت. سپس بافت‌ها آماده‌سازی، آب‌گیری و پارافینه شدند. به‌منظور آبگیری بافت، نمونه‌ها به‌مدت یک ساعت به‌ترتیب در الکل ۵۰ درصد، ۷۰ درصد، ۹۰ درصد و مطلق قرار داده شدند تا آب بافت جذب الکل شده و الکل جایگزین آن شود. بعد از آن، نمونه‌ها به‌مدت یک ساعت در داخل محلول زایلن قرار داده شدند تا زایلن جایگزین الکل شود (Ehsani tabatabaeii and Pourrahimi, 2015). در مرحله پارافینه کردن بافت‌ها و قالب‌گیری، نمونه‌ها در داخل پارافین مذاب قرار گرفتند تا پارافین به داخل بافت نفوذ کند.

برش بافت‌ها

نمونه‌ها همراه با قالب پارافین بوسیله دستگاه میکروتوم به ضخامت هفت میکرومتر برش داده شدند و بعد از آن در آب ۴۸ تا ۵۳ درجه سلسیوس قرار داده شدند تا چین‌وچروک احتمالی آن‌ها باز و بافت حالت برش یک‌دست پیدا کند. سپس نمونه‌های مورد نظر روی لام منتقل شدند (Ehsani tabatabaeii and Pourrahimi, 2015). بعد از خارج کردن پارافین موجود در بافت‌ها با گزیلن و الکل، نمونه‌ها با رنگ هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند. برای اندازه‌گیری طول و عرض پرز و عمق کریپت، با استفاده از میکروسکوپ لایکا (Leica مدل DM 1000، آمریکا) و دوربین دیجیتال Sony واقع در دانشکده گیاه‌پزشکی دانشگاه گیلان با لنز 10x از لام‌های به‌دست‌آمده عکس برداری صورت گرفت. نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت برحسب میکرومتر (Ebrahimi *et al*., 2017) و مساحت سطح پرز مطابق معادله ۴ (Gangali *et al*., 2015) محاسبه گردید.

معادله (۴)

$$VSA = \tfrac{1}{2} \times VW \times VH \times 2\pi$$

که در آن، VSA: مساحت سطح پرز، VW: عرض پرز و VH: ارتفاع پرز می‌باشند.

تعیین جمعیت باکتریایی دستگاه گوارش با استفاده از روش Real-Time PCR

برای بررسی جمعیت لاکتوباسیلوسی دستگاه گوارش در ۴۲ روزگی، دو جوجه از هر قفس انتخاب و سکوم آن‌ها جدا شد. سپس سکوم‌ها داخل فالکون ۵۰ قرار گرفتند و تا انجام آزمایش‌ها داخل فریزر نگهداری شدند (Shokryazdan *et al*., 2017).

استخراج DNA از سکوم

DNA نمونه‌ها براساس دستورالعمل کیت Favorgen محصول کشور تایوان (Biotech Corp) استخراج شد. بعد از آنکه نمونه‌های DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000) مورد غلظت‌سنجی قرار گرفتند و کیفیت آن‌ها با استفاده از ژل آگارز دو درصد مورد ارزیابی قرار گرفت، برای رسیدن به غلظت ۱۰۰ نانوگرم و در حجم ۲۵ میکرولیتر، رقیق شدند.

Real time–PCR

به‌منظور سنجش Real-time PCR، DNA کل از نمونه‌های سکوم استخراج شد. منحنی‌های استاندارد با استفاده از تعداد کپی‌های ژن 16S rRNA در برابر چرخه کمی (Cq) به‌دست‌آمده از رقت‌های سریالی ۱۰ برابری محصولات PCR از کشت خالص هر گروه باکتریایی رسم شد. به‌منظور آماده‌سازی منحنی‌های استاندارد، DNA از کشت خالص باکتری هدف (*لاکتوباسیلوس*) استخراج شد و PCR معمول برای تکثیر DNA باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت. فرآورده های PCR باکتری‌های هدف روی ژل آگارز یک درصد ران شدند و باندهای اختصاصی با استفاده از کیت خالص‌سازی، جدا شدند. خلوص و غلظت ژن 16S rRNA در هر نمونه نیز با استفاده از نانودراپ اندازه‌گیری شد. تعداد کپی‌های ژن 16S rRNA در هر میلی‌لیتر از elution buffer با استفاده از معادله ۵ محاسبه گردید.

معادله (۵)

$$\text{copy number} = \left| \frac{amount\ of\ DNA\ (\mu g\ ml) * \frac{6}{022} * 10^{23}}{length\ (bp) *\ 10^{9} * 650} \right.$$

آغازگر مورد استفاده در کمّی‌سازی جمعیت باکتری

لاکتوباسیلوس در جدول ۲ نشان داده شده است. واکنش در حجم کلی ۱۵ میکرولیتر با استفاده از SYBR Green Master Mix انجام شد. هر واکنش شامل ۷/۵ میکرولیتر SYBR Green Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای رفت‌وبرگشت با غلظت ۱۰ میکرومولار، دو میکرولیتر نمونه DNA و ۴/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود. هر نمونه با واکنش‌های با دو تکرار مورد سنجش قرار گرفت. شرایط چرخه زمان واقعی PCR شامل یک دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه و به‌دنبال آن ۴۰ چرخه واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه بود. اتصال آغازگر در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه انجام شد، همچنین گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه بود. به‌محض تکمیل تکثیر، اختصاصی بودن فرآورده‌های تکثیرشده به‌وسیله آنالیز منحنی ذوب تأیید شد. برای این منظور، فرآورده‌های Real-time PCR با افزایش دما از ۵۵ به ۹۵ با افزایش ۰/۵ درجه‌ای به‌مدت پنج ثانیه در هر افزایش انکوبه شدند. نتایج به‌صورت log_{10} تعداد کپی در هر گرم محتوای سکوم بیان شد (Shokryazdan *et al.*, 2017).

جدول ۲– آغازگرهای مورد استفاده جهت تعیین جمعیت *Lactobacillus* با استفاده از تکنیک Real-time PCR

Table 2- Primer sequence used for *Lactobacillus* population using Real-time PCR

گروه هدف Target group		توالی‌ها Sequences	مرجع Reference
لاکتوباسیلوس *Lactobacillus*	F	CATCCAGTGCAAACCTAAG	Shokryazdan *et al.*, 2017
	R	GATCCGCTTGCCTTCG	

طرح آماری و تجزیه داده‌ها

بعد از جمع‌آوری اطلاعات، تجزیه آماری داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از رویه GLM بسته نرم‌افزاری SAS انجام شد (Rastad *et al.*, 2008). مقایسه میانگین تیمارها برای صفات مورد بررسی با استفاده از آزمون دانکن در سطح پنج درصد ($P<$ ۰/۰۵) انجام شد.

نتایج و بحث

میانگین مصرف خوراک روزانه

در دوره‌های آغازین و رشد، از نظر میزان خوراک مصرفی هیچ یک از تیمارهای پروبیوتیک بومی مورد استفاده با شاهد (بدون افزودنی) اختلاف معنی‌داری نداشتند. بررسی میزان خوراک مصرفی در ۲۵–۴۲ روزگی و در کل دوره پرورش نیز نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای پروبیوتیک بومی با شاهد و تیمار پروبیوتیک تجاری مورد استفاده بود (جدول ۳). همسو با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، تعدادی از مطالعات عدم تأثیر پروبیوتیک‌ها بر صفات عملکرد (Sarangi *et al.*, 2016) در جوجه‌های گوشتی را گزارش نمودند. محمودتبار و همکاران (Mahmood Tabar *et al.*, 2018) نیز که به مقایسه اثر پروبیوتیک‌های مختلف بر مؤلفه‌های عملکردی طیور پرداختند، گزارش کردند که تفاوت معنی‌داری از لحاظ صفت مقدار خوراک مصرفی در سه دوره آغازین، رشد و پایانی بین تیمارپروبیوتیک و گروه شاهد مشاهده نشد.

در تضاد با نتایج به‌دست‌آمده، محققان در پژوهشی دیگر به این نتیجه رسیدند که استفاده از مکمل پروبیوتیک چند سویه‌ای (*L..casei, L. acidophilus, Bifidobacterium*) به‌میزان یک درصد در آب آشامیدنی اثرات مثبت روی افزایش مصرف خوراک در جوجه‌های گوشتی دارد (Zhang *et al.*, 2021). یافته‌های هه و همکاران (He *et al.*, 2019) نیز نشان‌دهنده تأثیر مثبت مکمل پروبیوتیک (*باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس لیکنیفورمیس و ساکارومایسس سرویزیه*) به‌مقدار ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در جیره، بر افزایش میزان خوراک مصرفی بود. پاسخ پرنده به افزودنی‌های خوراکی به مواردی همچون عوامل تنش‌زای محیطی و میزان آن‌ها، ترکیبات جیره، ویژگی‌های پرنده (سن، جنس، گونه و مرحله پرورش) و ویژگی‌های محصول پروبیوتیکی مانند نوع و مقدار مصرف، ترکیب گونه باکتری، روش و دفعات استفاده بستگی دارد که به‌عنوان علل اختلاف در نتایج تحقیقات مختلف مطرح می‌شوند (Mikulski *et al.*, 2012). همچنین بیان شده است که اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها در جوجه‌های گوشتی با سرعت رشد بالا، کمتر از پرندگان دارای سرعت رشد پائین می‌باشد (Timmerman *et al.*, 2006). تمامی عوامل گفته‌شده در بالا می‌توانند در عدم تأثیر این صفت از مصرف پروبیوتیک‌ها مؤثر باشند.

افزایش وزن روزانه

طی دوره آغازین و رشد پرورش، هیچ یک از تیمارهای پروبیوتیکی بومی مورد استفاده اختلاف معنی‌داری با شاهد و بیوپول نشان ندادند. در دوره پایانی رشد یا ۲۵–۴۲ روزگی از نظر عددی بالاترین افزایش وزن روزانه مربوط به تیمارهای Plr2 و Plr12 بود. همچنین تیمار Plr10 منجر به کمترین میزان افزایش وزن روزانه در مقایسه با سایر ترکیبات پروبیوتیکی در این دوره از رشد گردید. در کل

دوره پرورش نیز افزایش وزن روزانه در تیمارهای Plr2، Plr11 و Plr12 بالا بود، امّا نسبت به تیمارهای شاهد و بیوپول تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. در تضاد با نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق، گزارشاتی مبنی بر تأثیر معنی‌دار پروبیوتیک‌ها بر افزایش وزن روزانه وجود دارد. در این راستا، اسدی و همکاران (Asadi *et al*., 2019) گزارش کردند که تأثیر پروبیوتیک بر افزایش وزن، ممکن است به‌دلیل رقابت میان باکتری‌های موجود در ترکیبات پروبیوتیک با جمعیت‌های میکروبی دستگاه گوارش باشد. لذا هرچه باکتری‌ها زمان بیش‌تری داشته باشند (مدت زمان مصرف پروبیوتیک و استقرار در دستگاه گوارش)، در رقابت با جمعیت‌های میکروبی دستگاه گوارش مؤثرتر خواهند بود. نتایج تحقیق هوانگ و همکاران (Huang *et al*., 2019) ناظر بر اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها بر افزایش وزن روزانه در طیور می‌باشد. گادی و همکاران (Gadde *et al*., 2017) نیز تغییرات قابل توجهی در افزایش وزن روزانه جوجه‌های گوشتی در پاسخ به پروبیوتیک در روز ۱۴ام دوره پرورش ثبت کردند. همچنین در پژوهشی دیگر، ما و همکاران (Ma *et al*., 2018) مشاهده کردند که وزن جوجه‌های گوشتی در اثر استفاده از مکمل پروبیوتیک *باسیلوس سوبتیلوس* به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است. علت عدم تطابق نتایج به‌دست‌آمده با یافته‌های محققین فوق ممکن است به تفاوت در نوع ترکیبات مورد استفاده و شرایط آزمایش مربوط باشد.

ضریب تبدیل خوراک

نتایج مربوط به اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین ضریب تبدیل خوراک در دوره‌های مختلف پرورش در جدول ۳ نشان داده شده است. این نتایج حاکی از آن است که در دوره آغازین پرورش، هیچ یک از تیمارهای پروبیوتیک مورد استفاده نسبت به شاهد و بیوپول تفاوت معنی‌داری نداشتند و نتوانستند در مقایسه با این تیمارها منجر به کاهش معنی‌دار ضریب تبدیل خوراک گردند. در دوره رشد (۲۴-۱۱ روزگی) نیز ترکیبات پروبیوتیکی Plr2، Plr11 و Plr12 در مقایسه با تیمار بیوپول منجر به کاهش معنی‌دار ضریب تبدیل شدند ($P<0.05$) که این امر نشان‌دهنده برتری ترکیبات پروبیوتیک بومی مورد استفاده بر پروبیوتیک تجاری بیوپول می‌باشد. لی و همکاران (Li *et al*., 2014) گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره طیور منجر به بهبود ضریب تبدیل خوراک می‌گردد که این امر به‌دلیل تقویت میکروفلور مفید، حذف رقابتی بیمارگرها با آزادسازی باکتریوسین‌ها و تحریک سیستم ایمنی، افزایش ترشح آنزیم‌های گوارشی (مانند بتاگالاکتوزیداز، آلفا آمیلاز و ...) می‌باشد که در نهایت، سبب افزایش راندمان هضم و جذب مواد مغذی شده و در نتیجه، عملکرد رشد حیوانات را بهبود می‌بخشند (Jadhav *et al*., 2015; Soomro *et al*., 2019; Hack *et al*., 2020). برخی محققان نیز به این نتیجه رسیده‌اند که استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره جوجه‌های گوشتی روی مقدار ضریب تبدیل غذایی تأثیر مثبت و معنی‌داری ندارد (Sarangi *et al*., 2016; Jacquier *et al*., 2019). تفاوت در نتایج به‌دست‌آمده از آزمایشات متفاوت ممکن است به‌دلیل تفاوت در سویه باکتری پروبیوتیک مورد استفاده، تعداد سویه، دوز مصرفی، سن جوجه و ترکیب جیره (به‌ویژه میزان پروتئین آن) باشد (Chen *et al*., 2017).

تیترهای آنتی‌بادی علیه SRBC تزریق‌شده

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های مربوط به اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین مقدار آنتی‌بادی‌های IgG و IgM در روزهای ۳۰ و ۴۲ در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج حاصل نشان داد که همه تیمارهای پروبیوتیک بومی مورد استفاده به‌غیر از Plr2 در ۳۰ روز اول پرورش منجر به افزایش در میزان آنتی‌بادی IgG در مقایسه با شاهد شدند که این افزایش در تیمار Plr12 نسبت به شاهد بیشتر و معنی‌دار بود ($P<0.01$). علاوه‌براین در این دوره از رشد تفاوت معنی‌داری میان ترکیبات پروبیوتیک بومی و پروبیوتیک تجاری به لحاظ افزایش در میزان آنتی‌بادی IgG مشاهده نشد. از لحاظ تولید IgM در ۳۰ روز اول پرورش نیز تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای پروبیوتیک بومی، بیوپول و شاهد مشاهده نشد. بررسی میزان تولید IgG پس از دومین تزریق نیز حاکی از آن بود که تمام ترکیبات پروبیوتیک بومی مورد استفاده منجر به افزایش معنی‌دار این آنتی‌بادی در مقایسه با شاهد بدون افزودنی شدند که این افزایش به لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P<0.01$). IgM تولیدی نیز در ۴۲ روز پس از تزریق SRBC در تیمارهای بیوپول، Plr9، Plr10، Plr11 و Plr12 به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بدون افزودنی بود ($P<0.01$)، امّا تیمار Plr2 اختلاف معنی‌داری با شاهد به‌لحاظ تولید این آنتی‌بادی نشان نداد. پروبیوتیک‌ها با تأثیر بر باکتری‌های مضر دستگاه گوارش و تحریک ایمنی موضعی، موجب افزایش فاکتورهای ایمنی هومورال می‌شوند. بهبود و تحریک سیستم ایمنی به‌وسیله پروبیوتیک‌ها ممکن است به سه طریق انجام شود: ۱- افزایش تولید ایمونوگلوبولین‌های G، M و اینترفرون‌ها، ۲- افزایش تولید آنتی‌بادی موضعی در سطوح مخاطی بدن از قبیل دیواره روده که معمولاً از نوع IgA هستند (Villena *et al*., 2008) و ۳- افزایش فعالیت ماکروفاژهایی که از طریق افزایش فاگوسیتوز میکروارگانیسم‌ها نمایان می‌شوند (Jing *et al*., 2017). تأثیر و کارآیی پروبیوتیک‌ها در تحریک سیستم ایمنی و تقویت پاسخ آنتی‌بادی به عواملی چون نوع پادتن، تعداد باکتری‌های موجود در پروبیوتیک، دوز مؤثر مصرف‌شده و زمینه ژنتیکی میزبان وابسته است (Haghighi *et al*., 2005). اجزاء دیواره سلولی باکتری‌ها، مانند پپتیدوگلیکان‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدها، نیز در تعامل با باکتری‌ها و ریزجانداران دیگر نقش مهمی دارند.

جدول ۳- اثر تیمارهای آزمایشی بر مصرف خوراک، افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراک جوجه‌های گوشتی (گرم/جوجه/روز)[۱]

Table 3- Effect of experimental treatments on feed intake, daily weight gain and feed conversion ratio in broilers (g/chick/day)[1]

دوره پرورش/تیمار Breeding period/treatment	NC	Pbio	Plr2	Plr9	Plr10	Plr11	Plr12	SEM	P-value
مصرف خوراک روزانه Daily feed intake									
آغازین Initial (1-10 d)	25.28	26.05	25.97	26.62	25.06	25.97	26.67	0.9233	0.9313
رشد Grower (11-24 d)	78.24	83.40	76.43	80.41	71.76	73.43	80.57	2.6671	0.1531
پایانی Finisher (25-42)	162.17	163.46	162.27	160.60	154.38	158.66	168.03	5.0604	0.3976
کل Total (1-42)	94.70	97.68	94.64	95.25	89.78	92.59	98.34	3.0148	0.1929
افزایش وزن روزانه Daily weight gain									
آغازین Initial (1-10 days)	16.65	17.59	16.93	17.67	16.69	16.33	17.27	1.1229	0.8376
رشد Growth (11-24 days)	46.17	46.44	47.83	48.74	43.02	46.35	49.18	3.1281	0.4632
پایانی Final (25-42 days)	87.90	89.29	96.00	88.61	80.71	92.43	93.46	2.4541	0.3232
کل Total (1-42 days)	53.48	54.54	57.36	54.93	49.90	55.55	56.90	2.1730	0.3964
ضریب تبدیل خوراک Feed conversion ratio									
آغازین Initial (1-10 days)	1.51	1.50	1.53	1.50	1.50	1.59	1.54	0.0542	0.6218
رشد Growth (11-24 days)	1.69^{bc}	1.80^{c}	1.60^{ab}	1.65^{bc}	1.67^{bc}	1.58^{ab}	1.63^{b}	0.0191	0.0302
پایانی Final (25-42 days)	1.85	1.83	1.69	1.81	1.92	1.71	1.80	0.1476	0.6100
کل Total (1-42 days)	1.77	1.79	1.65	1.73	1.80	1.66	1.73	0.0533	0.9213

[۱] جیره پایه (برمبنای ذرت و سویا)، NC: بدون افزودنی، کنترل منفی، Pbio: پروبیوتیک تجاری (بیوپول) + جیره پایه، کنترل مثبت، Plr2: جیره پایه + 1.36×10^{9} CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه، Plr9: جیره پایه + 1.36×10^{9} CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه و *L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران، Plr10: جیره پایه + 1.36×10^{9} CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه و *L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران و *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شوش، Plr11: جیره پایه + 1.36×10^{9} CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه، *L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران و *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شوش و *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شفت، Plr12: جیره پایه + 1.36×10^{9} CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه، *L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران، *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شفت، *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شوش، *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی ماسال

[1] Basal ration (based on corn and soybean meal), non-additive, negative control (NC), Basal ration + commercial probiotic (Biopol), positive control, Basal ration + 1.36×10^{9} CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen (Plr_2), Basal ration + 1.36×10^{9} CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck (Plr_9), Basal ration + 1.36×10^{9} CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck and *L. Reuteri* isolated from Shush native hen (Plr_{10}), Basal ration + 1.36×10^{9} CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck and *L. Reuteri* isolated from Shush native hen and *L. Reuteri* isolated from Shaft native hen (Plr_{11}), Basal ration + 1.36×10^{9} CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck and *L. Reuteri* isolated from Shush native hen and *L. Reuteri* isolated from Shaft native hen and *L. Reuteri* isolated from Masal native hen (Plr_{12})

برخی از باکتری‌های پروبیوتیک، به‌ویژه لاکتوباسیل‌ها، می‌توانند سیستم ایمنی را تحریک کرده و به‌عنوان سلول‌های زنده در دیواره روده تکثیر شوند. این باکتری‌ها قادرند که پادتن‌های آزادشده توسط ریزجانداران مرده را جذب کرده و به‌طور مستقیم بر سیستم ایمنی تأثیر بگذارند. همچنین، ریزجانداران موجود در پروبیوتیک پس از ورود به دستگاه گوارش و آزادسازی متابولیت‌های خود، موجب فعال‌سازی سیستم ایمنی می‌شوند که این امر می‌تواند پاسخ ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی میزبان را تقویت کند و به مهار بیماری‌های عفونی کمک کند. نتایج این تحقیق، با یافته‌های تعدادی از مطالعات که تأثیر پروبیوتیک‌ها بر تقویت سیستم ایمنی را نشان داده‌اند، مطابقت دارد (Bilal *et al*., 2021Terada *et al*., 2020;). فاضل‌نیا و همکاران (Fazelnia *et al*., 2021) نشان دادند که مکمل غذایی پروبیوتیک و سین‌بیوتیک، پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی را بهبود می‌بخشد. در پژوهشی دیگر، آوایس و همکاران (Awais *et al*., 2019) گزارش کردند که گنجاندن یک گرم پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس* و *ساکارومایسس* در جیره غذایی می‌تواند سیستم ایمنی بدن را تحریک و تکثیر ریزجانداران مفید در روده را افزایش دهد. با توجه به افزایش آنتی‌بادی تولیدی علیه SRBC، می‌توان گزارش نمود که ترکیبات پروبیوتیک ترکیبی مورد استفاده در این پژوهش منجر به بهبود وضعیت ایمنی شدند. پاسخ ثانویه آنتی‌بادی در ۴۲ روز پس از تزریق SRBC با قدرت بیشتری همراه است، زیرا با افزایش سن جوجه‌ها، سیستم ایمنی آن‌ها تکامل بیشتری می‌یابد و سلول‌های خاطره تولید شده در پاسخ ایمنی اولیه، منجر به تشدید تولید آنتی‌بادی در پاسخ ثانویه می‌شوند.

جدول ٤– اثر تیمارهای آزمایشی بر پاسخ ایمنی علیه SRBC تزریق‌شده در روزهای ۳۰ و ۴۲ پرورش (اعداد بر مبنای log_2 است)[۱]

Table 4- Effect of experimental treatments on immune response against injected SRBC in 30 and 42 days of growth (values are log_2 base) [1]

تیمارها Treatments	NC	Pbio	Plr2	Plr9	Plr10	Plr11	Plr12	SEM	P-value
ایمونوگلوبولین G (در روز ۳۰ ام) IgG (30)	3.37[b]	5.25[ab]	2.75[bc]	5.75[ab]	4.87[ab]	5.07[ab]	5.92[a]	0.3601	0.0021
ایمونوگلوبولین M (در روز ۳۰ ام) IgM (30)	2.00	2.25	2.37	2.37	2.12	2.12	2.62	0.2711	0.1835
ایمونوگلوبولین G (در روز ۴۲ ام) IgG (42)	4.12[b]	5.00[ab]	6.87[a]	6.75[a]	6.12[a]	6.87[a]	6.75[a]	0.3479	0.0008
ایمونوگلوبولین M (در روز ۴۲ ام) IgM (42)	2.12[c]	3.12[ab]	2.37[bc]	3.87[a]	2.75[ab]	3.12[ab]	3.62[ab]	0.2977	0.0062

[۱]جیره پایه (برمبنای ذرت و سویا)، NC: بدون افزودنی، کنترل منفی، Pbio: پروبیوتیک تجاری (بیوپول) + جیره پایه، کنترل مثبت، Plr2: جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه، Plr9: جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه و *L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران، Plr10: جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه و*L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران و *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شوش، Plr11: جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه، *L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران و *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شوش و *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شفت، Plr12: جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه، *L. Salivarius*جداشده از اردک بومی مازندران، *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شفت، *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شوش،*L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی ماسال

[1]Basal ration (based on corn and soybean meal), non-additive, negative control (NC), Basal ration + commercial probiotic (Biopol), positive control, Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen (Plr_2), Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck (Plr_9), Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck and *L. Reuteri* isolated from Shush native hen (Plr_{10}), Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck and *L. Reuteri* isolated from Shush native hen and *L. Reuteri* isolated from Shaft native hen (Plr_{11}), Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck and *L. Reuteri* isolated from Shush native hen and *L. Reuteri* isolated from Shaft native hen and *L. Reuteri* isolated from Masal native hen (Plr_{12})

ریخت‌شناسی روده کوچک

نتایج مربوط به ریخت‌شناسی تهی‌روده جوجه‌های گوشتی در جدول ۵ نشان داده شده است. براساس نتایج مندرج در این جدول، تیمارهای Plr9، Plr11 و Plr12 بیشترین تأثیر را در افزایش طول

پرز داشتند که نسبت به شاهد و پروبیوتیک تجاری بیوپول از نظر آماری افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۱). توسعه روده می‌تواند منعکس‌کننده وضعیت یکپارچگی و سلامت دستگاه گوارش حیوان باشد. ازآن‌جاکه روده محل اصلی هضم و جذب مواد مغذی است، کارآیی جذب تا حد زیادی به ریخت‌شناسی آن بستگی دارد (Awad *et al.*, 2008). تحقیقات قبلی نشان داده است که ریخت‌شناسی روده، به‌ویژه ساختارهایی مانند پرز و کریپت، با ترکیب جیره غذایی تغییر می‌کند (Nain *et al.*, Samanya and Yamauchi, 2002; 2012). افزایش طول پرزها می‌تواند به افزایش سطح آن‌ها منجر شود که این امر قابلیت جذب مواد مغذی را بهبود می‌بخشد. تحقیقات نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌های مبتنی بر *لاکتوباسیلوس*‌ها موجب افزایش غلظت آنزیم آمیلاز و ارتفاع پرزها در روده می‌شوند (Fuentes *et al.*, 2013). بااین‌حال، سازوکار دقیق تأثیر باکتری‌های اسید لاکتیک بر بهبود ارتفاع پرز و فعالیت آنزیم آمیلاز هنوز به‌طور کامل مشخص نیست. امّا شواهد نشان می‌دهد که باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* می‌توانند باکتری‌های روده‌ای را تعدیل کرده و این امر به بهبود ارتفاع پرز و فعالیت آنزیم در سلول‌های پوششی روده کمک می‌کند (Van Immerseel *et al.*, 2006). بنابراین، افزایش طول پرزها در این مطالعه ممکن است ناشی از افزایش ظرفیت جذبی آن‌ها در پاسخ به مکمل‌سازی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* باشد. همچنین، احتمال دارد که افزایش تولید اسیدهای چرب فرار ناشی از هضم کربوهیدرات‌ها توسط این باکتری‌ها، به افزایش ارتفاع پرزها منجر شده باشد. نتایج این تحقیق با یافته‌های دیگر پژوهش‌ها که بهبود ویژگی‌های ریخت‌شناسی روده، از جمله طول پرزها را در اثر استفاده از پروبیوتیک‌ها گزارش کرده‌اند، همخوانی دارد (Awad *et al.*, 2006; Chamani, 2016). آلگاوانی و همکاران (Alagawany *et al.*, 2018) در یک تحقیق نشان دادند که پروبیوتیک‌هایی که شامل چند نوع باکتری مختلف هستند، می‌توانند ارتفاع پرزهای تهی‌روده را افزایش و عمق کریپت‌ها را کاهش دهند. این موضوع با نتایج تحقیق حاضر که نشان‌دهنده افزایش طول پرزهای تهی‌روده در نتیجه استفاده از سویه‌های ترکیبی Plr9، Plr11 و Plr12 همخوانی دارد. بااین‌حال، برخی از مطالعات نیز وجود دارند که هیچ تأثیر مثبتی از مکمل‌سازی پروبیوتیک‌ها بر طول پرزها و عمق کریپت‌ها گزارش نکرده‌اند. به‌عنوان مثال، اوهایمان و اوفونگو (Ohimain and Ofongo, 2012) هیچ تغییری در طول پرزها و عمق کریپت‌ها در روده کوچک پس از مصرف *لاکتوباسیلوس روترئی*، *انتروکوکوس فاسیوم*، *بیفیدوباکتریوم انیمالیس*، *پدیوکوکوس اسیدیلاکتیکی* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* مشاهده نشد. به نظر می‌رسد که ریزجانداران به‌کاررفته به‌عنوان پروبیوتیک تأثیرات متفاوتی روی مخاط روده‌ای دارند.

ارزیابی ریخت‌شناسی تهی‌روده در این مطالعه نشان داد که تفاوت عمق کریپت بین تیمارهای مختلف از نظر آماری معنی‌دار نیست. همچنین، بررسی نسبت‌های به‌دست‌آمده برای طول پرز به عمق کریپت نشان داد که این نسبت در تمامی تیمارهای پروبیوتیکی مورد استفاده نسبت به گروه شاهد بدون افزودنی و پروبیوتیک تجاری بیوپول به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (P<۰/۰۱). با توجه به اینکه نسبت طول پرزها به عمق کریپت یک معیار کارآمد برای تخمین ظرفیت گوارشی در روده کوچک محسوب می‌شود (Montagne *et al.*, 2003)، افزایش این نسبت نشان‌دهنده بهبود ریخت‌شناسی ناشی از مصرف پروبیوتیک‌ها است. همچنین، افزایش مساحت پرزها نیز در ترکیبات پروبیوتیکی تک و چند سویه نسبت به گروه شاهد بدون افزودنی به‌طور معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۱). پروبیوتیک تجاری بیوپول نیز تفاوت معنی‌داری از نظر این ویژگی با گروه شاهد داشت، امّا اختلاف آن با تیمارهای Plr2، Plr10 و Plr12 معنی‌دار نبود.

جمعیت باکتریایی دستگاه گوارش

نتایج حاصل از تعیین جمعیت باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* جوجه‌های گوشتی در جدول ۵ آورده شده است. نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده افزایش جمعیت باکتری‌های مفید دستگاه گوارش در اثر مصرف سویه‌های پروبیوتیکی مورد بررسی در آزمایش می‌باشد، به‌گونه‌ای که تیمارهای Plr9، Plr11 و Plr12 سبب افزایش معنی‌دار جمعیت باکتری *لاکتوباسیلوس* در مقایسه با شاهد و بیوپول شدند (P<۰/۰۱)، تیمارهای Plr2 و Plr10 نیز اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۱) نسبت به شاهد داشتند، امّا اختلاف آن‌ها نسبت به بیوپول معنی‌دار نشد.

اثر پروبیوتیک‌ها به عملکرد فیزیولوژیکی دستگاه گوارش مربوط می‌شود (هضم، جذب). پروبیوتیک‌ها می‌توانند بروز و طول مدت برخی از بیماری‌ها را به‌دلیل افزایش مقاومت کلونیزاسیون و اثرات بازدارنده مستقیم در برابر بیمارگرها کاهش دهند. آن‌ها می‌توانند ریزجانداران بیماری‌زا را به‌طور رقابتی از دستگاه گوارش میزبان حذف کنند (Mookiah *et al.*, 2014). این سازوکار ضدبیماری‌زا (حذف رقابتی) نشان می‌دهد که گونه‌های باکتریایی به‌شدت برای اتصال به گیرنده‌ها در مکان‌های اتصال خاص در دستگاه گوارش مبارزه و ممکن است که ترشح مواد ضدمیکروبی و رقابت برای مواد مغذی در دسترس را با هم ترکیب کنند و منجر به افزایش باکتری‌های مفید و کاهش باکتری‌های مضر شوند (Van Zyl *et al.*, 2020). علاوه‌براین، پروبیوتیک‌ها با کاهش pH در روده، رشد و تشکیل کلنی باکتری‌های بیماری‌زا را کاهش می‌دهند. در یک مطالعه مشخص شد که pH پایین‌تر در روده می‌تواند به تحریک رشد باکتری‌های مفید و کاهش رشد و تشکیل کلنی عوامل بیماری‌زای روده، به‌ویژه

اشرشیاکلی، *سالمونلا انتریکا*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا گالیناروم* منجر شود. کاهش این عوامل بیماری‌زا ممکن است که به‌طور مثبت بر کاهش سموم تولیدشده توسط این ارگانیسم‌ها تأثیر بگذارد و در نهایت، مشکلات روده‌ای را کاهش دهد (Dibner and Richards, 2005). نتایج این تحقیق با یافته‌های لی و همکاران (Lei *et al*., 2015) که اعلام کردند، استفاده از مقادیر ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پروبیوتیک (*باسیلوس آمیلولیکفاسینس*) در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی نتایج مثبتی در افزایش تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* روده داشته است، همخوانی دارد. ما و همکاران (Ma *et al*., 2018) نیز نشان دادند که مکمل‌های غذایی با پروبیوتیک *باسیلوس سوبتیلیس* باعث بهبود ترکیب میکروبی سکوم جوجه‌های گوشتی می‌شوند.

جدول ۵- اثر تیمارهای آزمایشی بر ریخت‌شناسی تهی‌روده و جمعیت باکتری‌های *Lactobacillus* در سکوم جوجه‌های گوشتی[۱]

Table 5- Effects of experimental treatments on jejunum morphology and *Lactobacillus* population in broilrs chickens cecum[1]

تیمارها Treatments	NC	Pbio	Plr2	Plr9	Plr10	Plr11	Plr12	SEM	P-value
طول پرز (میکرومتر) Villus length (µm)	946[c]	1123 [b]	1188[b]	1327 [a]	1156[b]	1319[a]	1356[a]	29.615	0.0006
عمق کریپت (میکرومتر) Crypt depth (µm)	169	151	141	141	149	149	149	5.861	0.2297
طول/عمق کریپت (میکرومتر) Villus length/crypt depth	5.59 [d]	7.44[c]	8.42[ab] [c]	9.41[a]	7.76[bc]	8.85[a] [b]	9.10[a]	0.3183	0.0021
مساحت سطح پرز (میکر.متر) Villus area	805[c]	1068 [b]	1108[a] [b]	1149 [a]	1108[a] [b]	1127[a]	1114[a] [b]	17.574	0.0005
اثر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت باکتری‌های *Lactobacillus* در سکوم جوجه‌های گوشتی Effects of experimental treatments on *Lactobacillus* population in broiler chickens cecum									
لاکتوباسیلوس *Lactobacillus* (log_{10} copy number g^{-1} cecal content)	6.32 [c]	6.81[b]	6.74[b]	7.78[a]	6.93[b]	7.93[a]	7.98[a]	0.0516	0.0004

[۱]جیره پایه (برمبنای ذرت و سویا)، NC: بدون افزودنی، کنترل منفی، Pbio: پروبیوتیک تجاری (بیوپول) + جیره پایه، کنترل مثبت، Plr2: جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه، Plr9: جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه و *L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران، Plr10: جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه و*L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران و *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شوش، Plr11: جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه، *L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران و *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شوش و *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شفت، Plr12: جیره پایه + 1.36×10^9 CFU/g باکتری *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی اشنویه، *L. Salivarius* جداشده از اردک بومی مازندران، *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شفت، *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی شوش، *L. Reuteri* جداشده از مرغ بومی ماسال

[1]Basal ration (based on corn and soybean meal), non-additive, negative control (NC), Basal ration + commercial probiotic (Biopol), positive control, Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen (Plr_2), Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck (Plr_9), Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck and *L. Reuteri* isolated from Shush native hen (Plr_{10}), Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck and *L. Reuteri* isolated from Shush native hen and *L. Reuteri* isolated from Shaft native hen (Plr_{11}), Basal ration + 1.36×10^9 CFU/g *L. Reuteri* isolated from Oshnavieh native hen and *L. salivarius* isolated from Mazandaran native duck and *L. Reuteri* isolated from Shush native hen and *L. Reuteri* isolated from Shaft native hen and *L. Reuteri* isolated from Masal native hen (Plr_{12})

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از پروبیوتیک‌های بومی در پرورش جوجه‌های گوشتی تأثیرات مثبتی بر عملکرد، سلامت و ایمنی پرندگان دارد. اگرچه در برخی موارد، تفاوت‌های معنی‌داری در میزان مصرف خوراک و افزایش وزن روزانه بین تیمارهای پروبیوتیکی و شاهد مشاهده نشد، امّا برخی از ترکیبات پروبیوتیکی مانند Plr2 و Plr12 به‌طور عددی بالاترین افزایش وزن روزانه را نشان دادند. همچنین، این پروبیوتیک‌ها منجر به افزایش تولید آنتی‌بادی‌های IgG و IgM شدند که نشان‌دهنده بهبود پاسخ ایمنی در جوجه‌ها است. از نظر ریخت‌شناسی روده کوچک، تیمارهای پروبیوتیکی تأثیر مثبتی بر طول پرزها و نسبت طول پرز به عمق کریپت داشتند که می‌تواند به بهبود جذب مواد مغذی کمک کند. علاوه‌براین، نتایج نشان‌دهنده افزایش جمعیت باکتری‌های مفید *لاکتوباسیلوس* در اثر مصرف این پروبیوتیک‌ها بود که می‌تواند به کاهش بروز بیماری‌ها و بهبود عملکرد گوارشی منجر شود. به‌طور

کلی، این یافته‌ها اهمیت استفاده از پروبیوتیک‌های بومی را در صنعت طیور تأیید می‌کند و پیشنهاد می‌کند که تحقیقات بیشتری برای بررسی اثرات طولانی‌مدت و سازوکارهای دقیق عملکرد این پروبیوتیک‌ها انجام شود.

References

1. Ahmed, S. T., Hoon, J., Mun, H. S., & Yang, C. J. (2014). Evaluation of *Lactobacillus* and *Bacillus*-based probiotics as alternatives to antibiotics in enteric microbial challenged weaned piglets. *African Journal of Microbiology Research*, *8*(1), 96-104. https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6355
2. Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Farag, M. R., Sachan, S., Karthik, K., & Dhama, K. (2018). The use of probiotics as eco-friendly alternatives for antibiotics in poultry nutrition. *Environmental Science Pollution Reserch, 25*, 10611-10618. https://doi.org/10.1007/s11356-018-1687-x
3. Amir Ebrahimi, N., Salehi Jouzani, G., & Ebrahimi, M. A. (2022). Native chicken-derived *Lactobacillus* spp. strains with high probiotic, cholesterol-assimilation and aflatoxin-degradation capabilities. *Iranian Journal of Microbiology*, *14*(2), 227–237. https://doi.org/10.18502/ijm.v14i2.9192
4. Apata, D. F. (2008). Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*(7), 1253-1258. https://doi.org/10.1002/jsfa.3214
5. Asadi, A., Faeleh, H., & Razzaghzadeh, S. (2019). Effect of given probiotic type on broiler chicken performance and carcass properties. *Applied Research in Animal Science*, *31*, 51-58. https://doi.org/10.22092/aasrj.2019.123658.1164
6. Awad, W. A., Böhm , J., Razzazi-Fazeli, E., Ghareeb, K., & Zentek, J. (2006). Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens. *Poultry Science*, *85*(6), 974-979. https://doi.org/10.1093/ps/85.6.974
7. Awad, W., Ghareeb, K., & Böhm, J. (2008). Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a synbiotic containing *Enterococcus faecium* and oligosaccharides. *Italian Journal of Molecular Science*, *9*, 2205-2216. https://doi.org/10.3390/ijms9112205
8. Awais, M. M., Jamal, M. A., Akhtar, M., Hameed, M. R., Anwar, M. I., & Ullah, M. I. (2019). Immunomodulatory and ameliorative effects of *Lactobacillus* and *Saccharomyces* based probiotics on pathological effects of eimeriasis in broilers. *Microbiology Pathogen*, *126*, 101-108. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.10.038
9. Bai, S. P., Wu, A. M., Ding, X. M., Lei, Y., Bai, J., Zhang, K. Y., & Chio, J. S. (2013). Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poultry Science*, *92*(3), 663-670. https://doi.org/10.3382/ps.2012-02813
10. Bilal, M., Si, W., Barbe, F., Chevaux, E., Sienkiewicz, O., & Zhao, X. (2021). Effects of novel probiotic strains of *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* on production, gut health, and immunity of broiler chickens raised under suboptimal conditions. *Poultry Science*, *100*(3), 100871. https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.11.048
11. Broom, L. J., & Kogut, M. H. (2018). The role of the gut microbiome in shaping the immune system of chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *204*, 44-51. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.10.002
12. Chen, F., Zhu, L., & Qiu, H. (2017). Isolation and probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* and *Pediococcus pentosaceus* in specific pathogen free chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, *19*, 325-332. https://doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0413
13. Cisek, A. A., & Binek, M. (2014). Chicken intestinal microbiota function with a special emphasis on the role of probiotic bacteria. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *17*(2), 385-394. https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0057
14. Chamani, M. (2016). Efficacy of Bactocell® and Toyocerin® as probiotics on growth performance, blood parameters and intestinal morphometry of turkey poults. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, *6*, 211-218. (In Persion).
15. Clavijo, V., & Flórez, M. J. V. (2018). The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poultry Science*, *97*(3), 1006-1021. https://doi.org/10.3382/ps/pex359
16. Dibner, J. J., & Richards, J. D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poultry Science*, *84*(4), 634-643. https://doi.org/10.1093/ps/84.4.634
17. Ebrahimi, E., Sobhani, R. S., & Zarghi, H. (2017). Effect of triticale level and exogenous enzyme in the grower diet on performance, gastrointestinal tract relative weight, jejunal morphology and blood lipids of Japanese quality. *Journal of Agricultural Science Technology*, *19*, 569-580. http://dorl.net/dor/20.1001.1.16807073.2017.19.3.3.2
18. Ehsani Tabatabaeii, F., & Pourrahimi, F. (2015). *Cell Biology Laboratory*. Payame Noor University Press, Iran. pp. 121-134. (In Persion).
19. Elbaz, A. M., Ibrahim, N. S., Shehata, A. M., Mohamed, N. G., & Abdel-Moneim, A. E. (2021). Impact of multi-

strain probiotic, citric acid, garlic powder or their combinations on performance, ileal histomorphometry, microbial enumeration and humoral immunity of broiler chickens. *Tropical Animal Health and Production*, *53*(1), 115. https://doi.org/10.1007/s11250-021-02554-0

20. Fazelnia, K., Fakhraei, J., Yarahmadi, H. M., & Amini, K. (2021). Dietary supplementation of potential probiotics *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Saccharomyces cerevisiae* and synbiotic improves growth performance and immune responses by modulation in intestinal system in broiler chicks challenged with *Salmonella typhimurium*. *Probiotics Antimicrobial Proteins*, *13*(4), 1081-1092. https://doi.org/10.1007/s12602-020-09737-5
21. Fuentes, C., Orozco, L., Vicente, J., Velasco, X., & Menconi, A. (2013). Effect of a lactic acid bacteria based probiotic, Floramax-B11®, on performance, bone qualities, and morphometric analysis of broiler chickens: an economic analysis. *Biological Systems*, *2*(113), 2.
22. Gadde, U., Kim, W. H., Oh, S. T., & Lillehoj, H. S. (2017). Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: A review. *Animal Health Research Review*, *18*, 26-45. https://doi.org/10.1017/S1466252316000207
23. Gangali, H., Raji, A. R., & Zarghi, H. (2015). Effect of post hatch delayed access to feed on performance, GIT physical and histological development and yolk absorption in young broiler chicks. *Biomedical Pharmacology Journal*, *8*, 945-955. https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.023
24. Grasman, K. A. (2010). *In vivo* functional test for assessing immunotoxicity in birds. *Methods in Molecular Biology*, *598*, 387-398. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-401-2_25.
25. Hack, M. E. A., Saadony, M. T., Shafi, M. E., Qattan, S. Y. A., Batiha, G. E., Khafaga, A. F., Moneim, A. M. E., & Alagawany, M. (2020). Probiotics in poultry feed: a comprehensive review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *104*(6), 1835-1850. https://doi.org/10.1111/jpn.13454
26. Haghighi, H. R., Gong, J., Gyles, C. L., Hayes, M. A., Sanei, B., Parvizi, P., Gisavi, H., Chambers, J. R., & Sharif, S. (2005). Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics in chickens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *12*(12), 1387-1392. https://doi.org/10.1128/CDLI.12.12.1387-1392.2005
27. He, T., Long, S., Mahfuz, S., Wu, D., Wang, X., Wei, X., & Piao, X. (2019). Effects of probiotics as antibiotics substitutes on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, and barrier function of broilers. *Animals*, *9*, 985-995. https://doi.org/10.3390/ani9110985
28. Huang, T., Peng, X. Y., Gao, B., Wei, Q. L., Xiang, R., Yuan, M. G., & Xu, Z. H. (2019). The effect of *Clostridium butyricum* on the gut microbiota, immune response and intestinal barrier function during the development of necrotic enteritis in chickens. *Frontiers Microbiology*, *10*, 2309. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02309
29. Jacquier, V., Nelson, A., Jlali, M., Rhayat, L., Brinch, K. S., & Devillard, E. (2019). *Bacillus subtilis* 29784 induces a shift in broiler gut microbiome toward butyrate producing bacteria and improves intestinal histomorphology and animal performance. *Poultry Science*, *98*, 2548-2554. https://doi.org/10.3382/ps/pey602
30. Jadhav, K., Katoch, S., Sharma, K., & Mane, B. G. (2015). Probiotics in broiler poultry feeds: A review. *Journal of Animalal Nutrition Physiology*, *1*, 4-16.
31. Jing, G. C., Jing, G., Sun, Z., Wang, H., Gong, Y., Huang, S., Ning, K., XU, J., & SU, X. (2017). Parallel META 3: Comprehensive taxonomical and functional analysis platform for efficient comparison of microbial communities. *Scientific Reports*, *7*, 40371. https://doi.org/10.1038/srep40371
32. Khalid, A. H., Ullah, K. S., Naveed, S., Latif, F., Pasha, T. N., Hussain, I., & Qaisrani, S. N. (2021). Effects of spray dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance and carcass characteristics, gut health, cecal microbiota profile and apparent ileal digestibility of protein, amino acids and energy in broilers. *Tropical Animal Health and Production*, *8*(53), 252-263. https://doi.org/10.1007/s11250-021-02684-5
33. Kulkarni, R. R., Gaghan, C., Gorrell, K., Sharif, S., & Taha-Abdelaziz, K. (2022). Probiotics as alternatives to antibiotics for the prevention and control of *Necrotic Enteritis* in chickens. *Pathogens*, *11*(6), 692. https://doi.org/10.3390/pathogens11060692
34. Lajis, A. F. B. (2020). Biomanufacturing process for the production of bacteriocins from Bacillaceae family. *Bioresource Bioprocess*, *7*(8). https://doi.org/10.1186/s40643-020-0295-z
35. Lei, X., Piao, X., Ru, Y., Zhang, H., Péron, A., & Zhang, H. (2015). Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based direct-fed microbial on performance, nutrient utilization, intestinal morphology and cecal microflora in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, *28*(2), 239-246. https://doi.org/10.5713/ajas.14.0330
36. Li, Y. B., Xu, Q. Q., Yang, C. J., Yang, X., Lv, L., Yin, C. H., & Yan, H. (2014). Effects of probiotics on the growth performance and intestinal micro flora of broiler chickens. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, *27*, 713-717.
37. Ma, K., Chen, W., Yan, S. Q., Liu, Z. Z., Lin, X. Q., Zhang, J. B., Gao, Y., Wang, T., Zhang, J. G., & Yang, Y. J. (2022). Purification, characterization, mode of action, and application of Jileicin, a novel antimicrobial from *Paenibacillus jilinensis* YPG26. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *70*(18), 5570-5578. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01458

38. Ma, Y., Wang, W., Zhang, H., Wang, J., Zhang, W., Gao, J., Wu, S., & Qi, G. (2018). Supplemental *Bacillus subtilis* DSM 32315 manipulates intestinal structure and microbial composition in broiler chickens. *Science Reports, 8*, 15358. https://doi.org/10.1038/s41598-018-33762-8
39. Mahmood Tabar, A., Amir Karimi Torshizi, M., Sharafi, M., & Mozhgani, N. (2018). The effect of some poultry probiotics produced in Iran on performance parameters, economic indices and small intestinal morphology of broilers. *Iranian Journal of Animal Science*, *49*(3), 415-425. (In Persion).
40. Mikulski, D. 1., Jankowski, J., Naczmanski, J., Mikulska, M., & Demey, V. (2012). Effects of dietary probiotic (Pediococcus acidilactici) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens. *Poultry science*, *91*(10), 2691-2700. https://doi.org/10.3382/ps.2012-02370
41. Montagne, L., Pluske, J. R., & Hampson, D. H. (2003). A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science Technology*, *108*, 95-117. https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00163-9
42. Mookiah, S., Sieo, C. C., Ramasamy, K., Abdullah, N., & Ho, Y. W. (2014). Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 94*(2), 341-348. https://doi.org/10.1002/jsfa.6365
43. Nain, S. Renema, R. A., Zuidhof, M. J., & Korver, D. R. (2012). Effect of metabolic efficiency and intestinal morphology on variability in n-3 polyunsaturated fatty acid enrichment of eggs. *Poultry Science*, *91*, 888-898. https://doi.org/10.3382/ps.2011-01661
44. Nakphaichit, M., Thanomwongwattana, S., Phraephaisarn, C., Sakamoto, N., Keawsompong, S., Nakayama, J., & Nitisinprasert, S. (2011). The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. *Poultry Science*, *90*(12), 2753-2765. https://doi.org/10.3382/ps.2011-01637
45. Ohimain, E. I., & Ofongo, R. T. (2012). The effect of probiotic and prebiotic feed supplementation on chicken health and gut microflora: a review. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, *4*(2), 135-143.
46. Rastad, A. H., Samie, A., & Daneshvar, F. (2008). Effect of Bactocell and dry whey on performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Journal of Crop Production and Processing*, *12*(43), 473-480. (In Persion)
47. Rehman, A., Arif, M., Sajjad, N., Al-Ghadi, M. Q., Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Alhimaidi, A. R., Elnesr, S. S., Almutairi, B. O., Amran, R. A.; Hussein, E. O. S., & Swelum, A. A. (2020). Dietary effect of probiotics and prebiotics on broiler performance, carcass, and immunity. *Poultry Science*, *99*(12), 6946-6953. https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.043
48. Royan, M., Alaie Kordghashlaghi, H., Afraz, F., Hashemi, M., Vahidi, S. M. F., & Seighalani, R. (2017). Screening *Lactobacilli* isolates from Northern Iran Backyard chickens as bio-control strategy against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, *24*(3), 423-430. https://doi.org/10.9775/kvfd.2017.19109
49. Samanya, M., & Yamauchi, K. (2002). Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis*. var. natto. *Comparative Biochemistry and Physiology, 133*, 95-104. https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00121-6
50. Sarangi, N. R., Babu, L. K., Kumar, A., Pradhan, C. R., Pati, P. K., & Mishra, J. P. (2016). Effect of dietary supplementation of prebiotic, probiotic, and synbiotic on growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Veterinary World, 9*, 313-319. https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.313-319
51. Shokryazdan, P., Faseleh, M., Jahromi, J. B., Liang, K., Ramasamy, C. C., & Ho, Y. W. (2017). Effects of *Lactobacillus salivarius* mixture on performance, intestinal health and serum lipids of broiler chickens. *PLoS ONE, 12*(5), e0175959. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175959
52. Soomro, R. N., Abd El-Hack, M. E., Shah, S. S., Taha, A. E., Alagawany, M., Swelum, A. A., Hussein, E. O. S., Ba-Aawdh, H. A., Saadeldin, I., El-Edel M. A., & Tufarelli, V. (2019). Impact of restricting feed and probiotic supplementation on growth performance, mortality and carcass traits of meat-type quails. *Animal Science Journal, 90*, 1388-1395. https://doi.org/10.1111/asj.13290
53. Terada, T., Nii, T., Isobe, N., & Yoshimura, Y. (2020). Effects of probiotics *Lactobacillus reuteri* and *Clostridium butyricum* on the expression of toll-like receptors, pro- and anti-inflammatory cytokines, and antimicrobial peptides in broiler chick intestine. *The Journal of Poultry Science*, *57*(4), 310-318. https://doi.org/10.2141/jpsa.0190098
54. Timmerman, H. M., Veldman, A., Van den Elsen, E., Rombouts, F. M., & Beynen, A. C. (2006). Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. *Poultry Science*, *85*(8), 1383-1388. https://doi.org/10.1093/ps/85.8.1383
55. Van Immerseel, F., Russell, J. B., Flythe, M. D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F., & Ducatelle, R. (2006). The use of organic acids to combat Salmonella in poultry: A mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology*, *35*(3), 182-188. https://doi.org/10.1080/03079450600711045
56. Van Zyl, W. F., Deane, S. M., & Dicks, L. M. T. (2020). Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. *Gut Microbes*, *12*(1), 1831339.

https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1831339
57. Villena, J., Medina, M., Vinti˜ni, E., & Alvarez, S. (2008). Stimulation of respiratory immunity by oral administration of *Lactococcus lactis*. *Canadian Journal of Microbiology*, *54*(8), 630-638. https://doi.org/10.1139/W08-052
58. Zhang, Z. F., & Kim, I. H. (2014). Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. *Poultry Science*, *93*(2), 364-370. https://doi.org/10.3382/ps.2013-03314
59. Zhang, L., Zhang, R., Jia, H., Zhu, Z., Li, H., & Ma, Y. (2021). Supplementation of probiotics in water beneficial growth performance, carcass traits, immune function, and antioxidant capacity in broiler chickens. *Open Life Science*, *16*, 311-322. https://doi.org/10.1515/biol-2021-0031